

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 25–30

Isolierung intakter Leberparenchymzellen durch eine modifizierte enzymatische Methode

Von H. Bojar¹), K. Balzer, K. Reiners²), Marianne Basler, W. Reipen und W. Staib

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 10. Juni/16. Oktober 1974)

Herrn Prof. Dr. Karl Hinsberg zum 80. Geburtstag gewidmet

Eine enzymatische Methode zur Isolierung intakter Parenchymzellen aus Rattenlebern mit einer Zellausbeute von 3–4 g Feuchtgewicht aus etwa 10 g schweren Lebern von 180–230 g schweren Tieren wird beschrieben. Nach einer in-vitro-Vorperfusion mit einem calciumfreien Medium wurde Kollagenase (200 mg/l) und Calciumchlorid (5,2 mmol/l) hinzugegeben und die Leber 15 Minuten bei 37°C perfundiert. Die mikromorphologische Unversehrtheit der Zelloberfläche wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop nachgewiesen. Mit dieser Methode isolierte Leberparenchymzellen übertrafen hinsichtlich der Gluconeogenese- und Proteinsyntheseraten Leberschnitte und nach anderen Verfahren gewonnene Zellen. ATP/ADP- und Lactat/Pyruvat-Quotienten als Parameter für den Energie- bzw. Redoxstatus lagen mit 5,69 bzw. 8,64 im physiologischen Bereich. Die Integrität der membranständigen Hormonrezeptoren wurde durch den Nachweis der Sensibilität gegenüber Adrenalin, Glukagon und Insulin belegt. Die Glykogendeposition in Hepatocyten gefasteter Ratten wurde durch Glukagon (0,3 µmol/l) und Adrenalin (1 µmol/l) um 84,9 bzw. 95,9 % vermindert. Ähnlich wirkungsvoll stimulierten beide Hormone die Glykogenolyse in Parenchymzellen gefütterter Tiere. Die Harnstoffsynthese wurde durch Glukagon (1 µmol/l) um 29,5 % stimuliert und durch Insulin (10 nmol/l) um 28,5 % gehemmt. Insulin unterdrückte in 10 nmolarer Konzentration den Glukagoneffekt auf die Harnstoffbildung.

Isolation of intact liver parenchymal cells by a modified enzymatic method

An enzymatic method is described for isolating intact parenchymal cells from rat livers. 3–4 g cells (wet weight) could be isolated from livers of rats weighing 180–230 g. After an *in vitro* preperfusion of 15 minutes with a Ca-free buffer, collagenase (200 mg/l) and calcium chloride (5.2 mmol/l) were added. Perfusion was continued for another 15 minutes at 37°C. Micromorphological integrity of cell membranes was demonstrated by scanning electron microscopy. With regard to rates of gluconeogenesis and protein synthesis, parenchymal cells isolated according to our method were found to be superior to liver slices and cells isolated by other methods. Ratios of ATP/ADP (5.69) and of lactate/pyruvate (8.64) as parameters of the energetic situation and the redox state resp. were found within the physiological range. Integrity of cell surface receptors was proved by their sensitivity to epinephrine, glucagon and insulin. Glucagon (0.3 µmol/l) and epinephrine (1 µmol/l) reduced glycogen deposition in hepatocytes of fasted rats by 84.9 % and 95.9 % resp. Both hormones stimulated glycogenolysis in parenchymal cells of fed rats to a similar extent. Urea synthesis was stimulated 29.5 % by glucagon (1 µmol/l), and inhibited 28.0 % by insulin (10 nmol/l). The stimulatory effect of glucagon (1 µmol/l) was abolished by insulin (10 nmol/l).

Einleitung

Die Interpretation von Stoffwechseluntersuchungen an der perfundierten Leber wird durch die Heterogenität der Zellpopulation erschwert. Darüber hinaus ist die Perfusionstechnik aufwendig und die Anzahl der gleichzeitig meßbaren Parameter begrenzt. Leberschnitte

¹) Auszugsweise wurde diese Arbeit vorgetragen auf der gemeinsamen Tagung der Biochemischen Gesellschaften der Bundesrepublik Deutschland, der Schweiz und Österreichs in Innsbruck, 2.–5. Oktober 1973 und auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Tübingen, 27. Februar–2. März 1974.

²) Die Arbeit beinhaltet wesentliche Teile der Dissertation von cand. med. K. Reiners (Med. Fak. der Universität Düsseldorf).

können in einer größeren Zahl aus einem Organ hergestellt werden und gestatten deshalb die gleichzeitige Untersuchung einer Reihe verschiedener Stoffwechselfunktionen. Die Nachteile dieses Modells liegen in einer starken Zellschädigung an den Schnittflächen, einer begrenzten Sauerstoff- und Substratdiffusion zu den tieferen Zelllagen sowie in der Zellheterogenität. Mit geeigneten Methoden zur Isolierung und Fraktionierung vitaler Leberzellen lassen sich diese Probleme lösen. Mit unserem Isolationsverfahren können z.B. aus einer Rattenleber homogene Parenchymzellsuspensionen für bis zu hundert verschiedene gluconeogenetische Experimente gewonnen werden. Die Arbeit von *Berry* und *Friend* (1) war die Grundlage für die Entwicklung einer eigenen Methode zur Isolierung von Parenchymzellen.

Material und Methoden

Versuchstiere

Es wurden mit Standardkost ernährte männliche Wistar-II-Ratten (180–230 g) verwendet. Hungertiere hatten 22–24 Stunden vor Versuchsbeginn gefastet.

Material

Kollagenase (EC 3.4.24.3) CLS Typ II wurde von der Firma Worthington, Freehold (USA) bezogen, Hyaluronidase (EC 4.2.2.1) Typ I (bovine testes) von der Firma Sigma, St. Louis (USA). Adrenalin stammte von der Firma Hoechst, Frankfurt; kristallines Rinderinsulin wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. *Brandenburg*, Aachen und synthetisches Glukagon von der Firma Hoechst, Frankfurt zur Verfügung gestellt. Pentex-Rinderalbumin (Fraktion V) der Firma Miles-Seravac, Maidenhead (England) wurde vor Gebrauch entfettet und dialysiert. [^{14}C]-Leucin bezogen wir von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig, alle übrigen Chemikalien (Reinheitsgrad p.a.) von der Firma Merck, Darmstadt. Substrate wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Testkombinationen der Firma Boehringer, Mannheim bestimmt. Das für einige Untersuchungen eingesetzte Aminosäuren-Gemisch enthielt mit Ausnahme des Leucins den Aminosäuren-Anteil des Medium 199 (2).

Leberschnitte

Leberschnitte wurden von einer in situ mit 50 ml eiskaltem *Krebs-Ringer*-Phosphat-Puffer (pH 7,4) entbluteten Leber mit einem Mikrotom nach *Stadie & Riggs* (3) angefertigt. Die Schnitte wogen 60–90 mg und waren 300–350 μm dick.

Leberzellen

Die von *Howard* et al. (4) angegebene Methode zur Isolierung von Leberzellen wurde ohne Modifikation übernommen.

Bei der von *Berry* (1) beschriebenen Methode wurde die in situ Perfusion durch in vitro Perfusion ersetzt.

Auf dieser Grundlage entwickelten wir das folgende Verfahren. Durch eine nicht rezirkulierende Vorperfusion in situ bei Raumtemperatur mit 150 ml calciumfreiem *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) wurde die Leber blutfrei gespült. Die Vorperfusion erfolgte mit einem Flow von 50–60 ml/min. Anschließend wurde das Organ entnommen und bei 37°C in vitro 15 Minuten rezirkulierend mit 100 ml calciumfreiem *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) bei einem Minutenvolumen von 50–60 ml perfundiert. Dem Perfusat wurde dann 20 mg Kollagenase, gelöst in 5 ml einer 12,2 g/l Calciumchloridlösung zugegeben (Endkonzentration im Perfusat 5,2 mmol/l). Nach weiteren 15 Minuten wurde das Organ in 30 ml calciumfreiem *Krebs-Ringer*-Phosphat-Puffer (pH 7,4; 4°C) in einem 200 ml Polyäthylenbecher aufgenommen, indem die Leberlappen mehrfach eingeschnitten und die Zellen durch vorsichtiges Schütteln innerhalb von 2 Minuten suspendiert wurden. Gleichzeitig wurde die Suspension mit Carbogen (5 Vol % CO_2 , 95 Vol % O_2) durchperlt. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylongewebe von 150 μm Maschenweite filtriert und auf ein Volumen von 80 ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation (4°C, 1 min, 500 U/min, Sorvall RC2-B, Rotor SS 34) trennten wir die Parenchymzellen von Zelldetritus und Nichtparenchymzellen. Der Waschvorgang wurde zweimal mit 80 ml *Krebs-Ringer*-Phosphat-Puffer (pH 7,4) wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurde das Zellpellet gewogen und mit *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) eine Zellsuspension hergestellt, von der wir aliquote Mengen den Inkubationsansätzen zugeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Ansätze unter Carbogenatmosphäre (5 Vol % CO_2 , 95 Vol % O_2) in Polyäthylenröhrchen (Szintillationsgefäße der Firma Packard Instrument, Frankfurt) in einem Schüttelbad inkubiert. Die Temperatur betrug 37°C, die Schüttelfrequenz 110–120/min, die Amplitude 2,5 cm.

ATP, ADP, Lactat, Pyruvat

600 mg Zellen wurden in 5 ml *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) mit 5,5 mmol/l Glucose, 20 g/l Albumin und 0,606 g/l

des Aminosäuren-Gemisches inkubiert. Nach 30 bzw. 60 min beendeten wir die Inkubation durch Zusatz von 1 ml 300 g/kg HClO_4 . Anschließend wurde unter Kühlung homogenisiert (30 s, 15 000 U/min, Ultra-Turrax der Firma Ika-Werk, Staufen), in einer Kühlzentrifuge (10 min, 20 000 U/min, Sorvall RC 2-B, Rotor SM 24) zentrifugiert und im Überstand nach Abpuffern mit 50 g/l K_2CO_3 -Lösung die angegebenen Substrate gemessen. Die Bestimmung des ATP erfolgte nach *Lamprecht & Trauttschold* (5).

Gluconeogenese

60 mg Zellen von Hungertieren wurden in 2 ml *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) mit 10 mmol/l Pyruvat inkubiert. Nach 60 min stoppten wir die Reaktion mit 0,2 ml 300 g/kg HClO_4 und zentrifugierten 10 min bei 3 000 U/min (Zentrifuge: Heraeus Christ, Osterode, Typ UJ3). Die Gluconeogeneseraten der Leberschnitte ließen sich nach Inkubation eines Schnittes in 2 ml des gleichen Puffers bestimmen. Nach 60 min wurde 0,5 ml 100 g/l Trichloressigsäure zugegeben und wie beschrieben zentrifugiert. Die Überstände setzten wir nach Abpuffern mit KHCO_3 zur Bestimmung des Glucosegehaltes ein.

Proteinsynthese

60 mg Zellen bzw. Leberschnitte wurden in 2 ml *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) mit 5,5 mmol/l Glucose, 0,606 g/l Aminosäuren-Gemisch und 100 μl Leucinlösung (entsprechend 0,2 μCi [^{14}C]-Leucin) 60 min inkubiert. Die Zugabe von 0,2 ml 300 g/kg HClO_4 beendete die Reaktion. Nach Zentrifugation (10 min, 3 000 U/min, Heraeus Christ, Typ UJ3) und drei Waschvorgängen mit 0,1 ml gesättigter Leucinlösung und 3 ml 60 g/kg HClO_4 wurde das Sediment in 0,5 ml Hyamine (Firma Packard, Frankfurt) aufgenommen. Je zweimal 0,2 ml davon wurden mit 10 ml *Bray*'scher Lösung versetzt und die Radioaktivität im Tri-Carb-Scintillation-Spectrometer Typ 3380 der Firma Packard bestimmt.

Glykogensynthese

In 3 ml *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4), dem die angegebenen Substrate (Lactat 10 mmol/l, Alanin 10 mmol/l, Fructose 10 mmol/l bzw. Glucose 30 mmol/l ohne oder mit Zusatz von 5, 10 oder 15 mmol/l Alanin) zugegeben waren, wurden 100 mg Zellen von Hungertieren 90 min inkubiert. Mit 9 ml heißer 300 g/l KOH wurde die Reaktion beendet. Die Bestimmung des Glykogens erfolgte nach *Seifter* et al. (6). Der Einfluß von Glukagon (0,3 $\mu\text{mol/l}$) bzw. Adrenalin (1 $\mu\text{mol/l}$) wurde bei einer Substratkonzentration von 30 mmol/l Glucose und 5 mmol/l Alanin untersucht; dabei benutzten wir die Versuchsanordnung wie vorstehend beschrieben.

Glykogenolyse

40 mg Zellen wurden in 1,2 ml *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) mit Glukagon (0,3 $\mu\text{mol/l}$) bzw. Adrenalin (1 $\mu\text{mol/l}$) 30 min inkubiert. Die Aufarbeitung und Glykogenbestimmung erfolgten wie zuvor beschrieben.

Harnstoffsynthese

70 mg Zellen wurden in 2 ml *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) mit 10 mmol/l Alanin unter Zusatz von Glukagon (1 $\mu\text{mol/l}$), Insulin (10 nmol/l) bzw. Glukagon und Insulin 60 min inkubiert und anschließend 5 min bei 3 000 U/min zentrifugiert (Sorvall RC2-B, Rotor SM 24). Im Überstand bestimmten wir den Harnstoffgehalt.

Bestimmung des Zelltrocken- und Zellfeuchtgewichtes

Als Trockengewicht wurde das Gewicht des Trichloressigsäure-unlöslichen Materials nach Trocknung bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz bezeichnet. 1 g des locker gepackten feuchten Zellpellets, das wir nach dem Waschen entsprechend den Angaben im Abschnitt „Leberzellen“ erhielten, entsprach im Mittel einem Trockengewicht des Trichloressigsäure-unlöslichen Materials von 78,6 mg.

Soweit die Ergebnisse auf das Zellfeuchtgewicht bezogen wurden, legten wir wegen des erheblichen Pufferanteils im obengenannten

Zellpellet nicht dessen Gewicht zugrunde, sondern ermittelten das Feuchtgewicht der Zellen nach Zentrifugation (1 min, 3 000 U/min Sorvall RC2-B, Rotor SM 24) von 1 ml der für die Versuche eingesetzten Zellsuspension. 1 g der abzentrifugierten Zellen entsprach im Mittel $1,41 \times 10^8$ Zellen.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem t-Test nach *Student*. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes.

Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen nach *Rosenbauer & Schlösser* (7) präpariert und im Rasterelektronenmikroskop (JEOL-JSM-U3) bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV photographiert. Für die Anfertigung der Aufnahmen sind wir Herrn Dr. H. W. Schlösser zu Dank verpflichtet.

Ergebnisse

Aus der etwa 10 g schweren Leber einer 180–230 g schweren Ratte ließen sich nach unserem Verfahren 3–4 g Parenchymzellen isolieren. Die Kontamination mit Nichtparenchymzellen betrug 3–5 %.

Die morphologische Analyse im Rasterelektronenmikroskop (Abb. 1) zeigte Parenchymzellen, die ihre polyedrische Gestalt verloren und sich abgerundet hatten. Die Zellen wiesen eine unregelmäßig granuliert Oberflächenstruktur auf; Membrandefekte waren nicht erkennbar.

Nach unserem Verfahren isolierte Zellen wurden verglichen mit Leberschnitten und mit Zellen, die nach den Methoden von *Howard* (4) und nach *Berry* (1) in unserem Laboratorium isoliert wurden. Dazu wurden die Gluconeogenese- und Proteinsyntheseraten herangezogen.

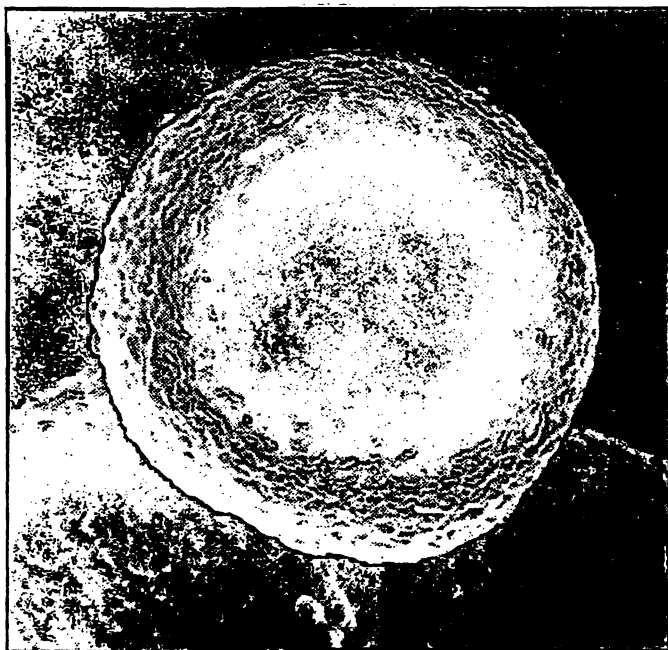


Abb. 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme isolierter Leberparenchymzellen (Vergrößerung etwa 2500 fach). Die Zellen haben ihre polyedrische Gestalt verloren und sich abgerundet. Sie weisen eine granuliert, teilweise flach gefurchte Oberfläche auf. Substanzdefekte der Zellmembran sind nicht erkennbar.

Die *Gluconeogeneseraten* aus 10 mmol/l Pyruvat waren bei Leberschnitten bzw. bei Zellen, die nach *Howard* (4) isoliert wurden, mit $65,84 \pm 8,04$ ($n = 5$) bzw. $65,51 \pm 11,07$ $\mu\text{mol Glucose/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$ ($n = 7$) etwa gleich hoch. Nach *Berry* (1) isolierte Zellen produzierten signifikant ($p < 0,05$) größere Mengen Glucose ($113,42 \pm 11,88$ $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$; $n = 12$). Mit $326,65 \pm 7,09$ $\mu\text{mol Glucose/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$ ($n = 8$) wiesen die nach unserem Verfahren isolierten Zellen etwa fünf- bzw. dreifach höhere Gluconeogeneseraten auf.

Bei der Messung der *Proteinsynthese* aus einem Aminosäuren-Gemisch unter Zusatz von $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-L-Leucin}$ erzielten sämtliche isolierten Zellen signifikant ($p < 0,05$) höhere Werte als Leberschnitte. Während bei Schnitten Einbauraten von $0,81 \pm 0,10$ $\mu\text{Ci/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$ ($n = 4$) gezählt wurden, erreichten nach *Howard* (4) isolierte Zellen $1,64 \pm 0,16$ $\mu\text{Ci/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$ ($n = 5$). Nach *Berry* (1) isolierte Zellen wiesen mit $3,19 \pm 0,56$ $\mu\text{Ci/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$ ($n = 4$) im Vergleich zu den Leberschnitten viermal höhere Einbauraten auf, nach unserem Verfahren isolierte Leberzellen mit $6,65 \pm 0,47$ $\mu\text{Ci/h} \cdot \text{g Trockengewicht}$ ($n = 7$) sogar die achtfachen Einbauraten von $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-L-Leucin}$.

Nachdem sich beim Vergleich der Gluconeogenese- und Proteinsyntheseraten die Überlegenheit unserer Isolationsmethode gezeigt hatte, wurden weitere Untersuchungen nur noch an den nach diesem Verfahren isolierten Zellen vorgenommen.

Zur Beurteilung des *Redox- und Energiestatus* wurden der Lactat/Pyruvat- bzw. der ATP/ADP-Quotient herangezogen. Der Lactat- und Pyruvatgehalt der Zellen wurde nach 30- und 60-minütiger Inkubation (siehe oben) bestimmt (jeweils $n = 9$). Nach 30 min ergab sich für Lactat ein Wert von $69,57 \pm 14,52$, für Pyruvat ein Wert von $9,83 \pm 2,21$ $\mu\text{mol/g Trockengewicht}$. Die entsprechenden Zahlen beliefen sich nach 60 min auf $68,57 \pm 15,70$ bzw. $8,37 \pm 2,14$ $\mu\text{mol/g Trockengewicht}$. Der Mittelwert des Lactat/Pyruvat-Quotienten betrug nach 30 min $7,25 \pm 0,51$ und nach 60 min $8,64 \pm 0,62$.

Der Gehalt der Zellen an ATP und ADP wurde nach einer Inkubation von 60 min bestimmt (jeweils $n = 9$). Für ATP ergab sich ein Wert von $8,56 \pm 1,18$, für ADP ein Wert von $1,59 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/g Trockengewicht}$. Die ATP/ADP-Quotienten lagen im Mittel bei $5,69 \pm 0,66$.

Nach unserer Methode isolierte Parenchymzellen gefasteter Tiere konnten aus verschiedenen Substraten *Glykogen* synthetisieren (Abb. 2). Der Basiswert des Glykogengehalts betrug $130 \pm 9,1$ $\mu\text{g Glykogen/g Feuchtgewicht}$. Aus Lactat bzw. Alanin in Konzentrationen von 10 mmol/l wurden 48 bzw. 66 $\mu\text{g Glykogen/90 min} \cdot \text{g Feuchtgewicht}$ gebildet. Fructose in gleicher Konzentration ließ den Glykogengehalt der Zellen sogar um 430 $\mu\text{g/90 min} \cdot \text{g Feuchtgewicht}$ steigen. Aus Glucose in einer Konzentration von 30 mmol/l wurden im gleichen Zeit-

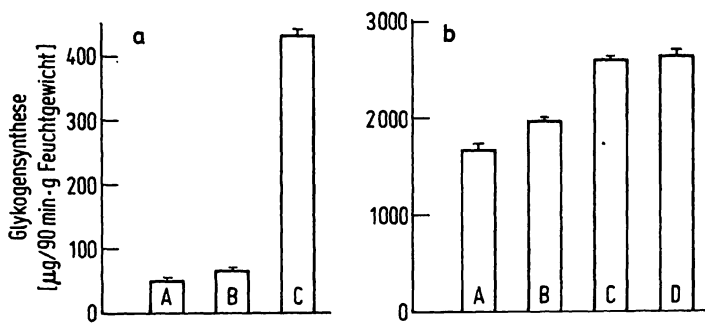


Abb. 2. Glykogensynthese isolierter Leberparenchymzellen von Hungertieren

100 mg Zellen wurden in 3 ml *Krebs-Ringer-Bicarbonat*-Puffer 90 min inkubiert. Folgende Substrate waren dem Medium zugesetzt:

- a) A: Lactat 10 mmol/l (n=4)
 B: Alanin 10 mmol/l (n=6)
 C: Fructose 10 mmol/l (n=3)
 b) A: Glucose 30 mmol/l (n=5)
 B: Glucose 30 mmol/l und Alanin 5 mmol/l (n=5)
 C: Glucose 30 mmol/l und Alanin 10 mmol/l (n=5)
 D: Glucose 30 mmol/l und Alanin 15 mmol/l (n=5)

raum $1,65 \pm 0,07$ mg Glykogen gebildet. Auf der Basis dieser Glucosekonzentration führten 5, 10 oder 15 mmol/l Alanin zu signifikant ($p < 0,05$) höheren Glykogensyntheseraten ($1,95 \pm 0,03$; $2,61 \pm 0,03$; $2,64 \pm 0,06$ mg Glykogen/90 min · g Feuchtgewicht). Der Effekt der Substratkombinationen ist deutlich höher als die Summe der Einzeleffekte.

Die *Hormonsensibilität* der nach unserer Methode isolierten Zellen wurde durch die Effekte von Glukagon, Adrenalin bzw. Insulin auf den Glykogenstoffwechsel und die Harnstoffsynthese belegt.

Der Einfluß von Glukagon und Adrenalin auf die Glykogenakkumulation (siehe Methodik) wurde in Parenchymzellen gefasteter Ratten bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen, deren Glykogengehalt am Ende der Inkubation ($1,95 \pm 0,03$ mg/g Feuchtgewicht) gleich 100 % gesetzt wurde, betrug der Anstieg des Glykogens in Anwesenheit von Glukagon (0,3 µmol/l) nur noch $15,1 \pm 1,6$ % (n = 5). Adrenalin in einer Konzentration von 1 µmol/l unterdrückte die Glykogenakkumulation fast vollständig ($4,1 \pm 0,7$ %; n = 5).

Beide Hormone stimulierten die Glykogenolyse in Parenchymzellen gefütterter Ratten. Der basale Glykogengehalt betrug $731 \pm 18,3$ µg/g Feuchtgewicht. Der niedrige Ausgangswert ist darauf zurückzuführen, daß alle Schritte der Zellisolierung in glucosefreien Medien durchgeführt wurden, um so den Sauerstoffbedarf der Zellen während der kritischen Isolationsphase herabzusetzen. Eine 30-minütige Inkubation der Zellen führte zu einer Abnahme des Glykogengehaltes um $175,5 \pm 14,4$ µg/g Feuchtgewicht (n = 5), während Glukagon (0,3 µmol/l) oder Adrenalin (1 µmol/l) den Glykogengehalt um $336,8 \pm 14,7$ bzw. $353,2 \pm 8,0$ µg/g Feuchtgewicht senkten (jeweils n = 5). Das entspricht einer Stimulierung der Glykogenolyse um 92,0 bzw. 101,4 %.

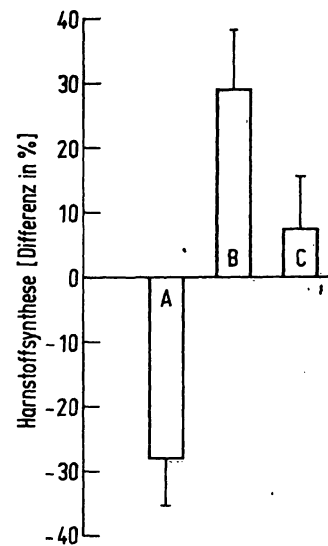


Abb. 3. Harnstoffsynthese isolierter Leberparenchymzellen

70 mg Zellen wurden in 2 ml *Krebs-Ringer-Bicarbonat*-Puffer mit 10 mmol/l Alanin 60 min inkubiert. Dem Medium waren folgende Hormone zugesetzt:

- A: Insulin 10 nmol/l (n=5)
 B: Glukagon 1 µmol/l (n=5)
 C: Insulin 10 nmol/l und Glukagon 1 µmol/l (n=5)

Angabe der durch die Hormone bewirkten Differenz. Ausgangswert: $4,10 \pm 0,35$ mg/h · g Feuchtgewicht.

Abbildung 3 zeigt den Einfluß von Glukagon und Insulin auf die Harnstoffbildung isolierter Leberparenchymzellen. In Gegenwart von 10 mmol/l Alanin wurden $4,10 \pm 0,35$ mg Harnstoff/h · g Feuchtgewicht gebildet. Glukagon (1 µmol/l) steigerte die Harnstoffsynthese auf $5,31 \pm 0,40$ mg (jeweils n = 5); das entspricht einer Stimulation um 29,5 %. Unter dem Einfluß von Insulin (10 nmol/l) wurden $2,95 \pm 0,31$ mg Harnstoff/h · g Feuchtgewicht (n = 5) gebildet, die Harnstofffreisetzung also um 28,0 % vermindert. Die gleichzeitige Gabe beider Hormone in den angegebenen Konzentrationen führte zu einer Harnstoffproduktion von $4,40 \pm 0,34$ mg/h · g Feuchtgewicht (n = 5), die sich nicht mehr signifikant vom Kontrollniveau unterschied.

Diskussion

Mit der von uns beschriebenen Isolierungsmethode lassen sich in nur 50 Minuten (Zeiten für Tieroperation und Zentrifugation eingerechnet) Leberparenchymzellen gewinnen. Den gleichen Zeitaufwand erfordern die Methoden von *Berry* (1) und *Ingebretsen & Wagle* (8). Für die Verfahren von *Howard* (4), *Hommes et al.* (9), *Johnson et al.* (10) und *Capuzzi et al.* (11) müssen dagegen 75–90 Minuten veranschlagt werden.

Mit unserem Verfahren und der Methode nach *Berry* (1) lassen sich aus einer 10 g schweren Leber $4-6 \times 10^8$ Zellen isolieren. Vergleichbar hohe Zellausbeuten wurden zwar von *Ingebretsen* (8) und *Johnson* (10) berichtet, ließen sich aber bei Anwendung ihrer Methoden von uns nicht reproduzieren (12). *Hommes* (9) und

Capuzzi (11) erhielten mit einer mittleren Zellzahl von 3 bzw. 2×10^8 pro 10 g Leber eine geringere Ausbeute. Die Anzahl der von *Howard* (4) aus 10 g Leber isolierten Zellen betrug nach Angaben des Autors in Übereinstimmung mit unseren Erfahrungen nur $2-8 \times 10^7$ Zellen. Die Verfahren von *Berry* (1) und *Howard* (4) erfordern wie die Methoden von *Capuzzi* (11), *Johnson* (10) und *Seglen* (13) Kollagenase und Hyaluronidase. *Howard* (4), *Berry* (1) und *Capuzzi* (11) benutzen hohe Konzentrationen an Kollagenase (500–730 mg/l). *Johnson* (10) hat in ihrer Isolierungsmethode vor allem die Kollagenasekonzentration (100 mg/l) reduziert, um störende Einflüsse von Verunreinigungen der verwendeten Enzyme zu vermindern. Da andererseits jedoch eine Senkung der Kollagenasekonzentration eine Verlängerung der Perfusionsdauer bedingt, benutzen wir eine mittlere Konzentration von 200 mg/l. Auf Hyaluronidase konnten wir wie *Ingebretsen* (8) verzichten. Nach Angaben von *Suzangar & Dickson* (14) führte die Verwendung von Hyaluronidase zu fast vollständigem Verlust zytoplasmatischer Enzyme wie z.B. Lactatdehydrogenase. Darüber hinaus beobachteten wir bei Isolierungsmethoden, in denen das Perfusat neben Kollagenase auch Hyaluronidase enthielt (1, 10), Rupturen der Pfortader durch Gefäßwanddigestion in der zweiten Hälfte der Perfusion. Solche Zwischenfälle beeinträchtigten die Reproduzierbarkeit der Methoden. Von *Johnson* (10) wurden z.B. Zellausbeuten von $2-10 \times 10^8$ Zellen pro Leber angegeben.

Hommes (9) konnte Leberzellen unter Verwendung von EDTA und Lysozym isolieren. Mit diesem Verfahren erhielten wir kaum Einzelzellen, sondern zumeist größere Zellverbände. Da außerdem mit dieser Methode isolierte Zellen eine zerstörte Ultrastruktur, niedrige Atmungsaktivität und hohe Enzymverluste aufwiesen (15), dürfte das Verfahren keine brauchbare Alternative zu den Verfahren mit Kollagenase und Hyaluronidase darstellen.

Die Entfernung von Calciumionen ist ein entscheidender Schritt zur Zellisolierung. Bei einigen enzymatischen Verfahren wird neben der Verwendung von calciumfreien Puffern noch der Zusatz von calciumbindenden Substanzen wie Citrat (11) bzw. EDTA (1, 9) empfohlen. Da z.B. EDTA zu Veränderungen der Permeabilität der Zellmembran und zur Zerstörung der Ultrastruktur von Zellen führte (11), verzichteten wir bei unserer Methode auf den Zusatz von calciumbindenden Substanzen. In Übereinstimmung mit *Seglen* (13) stellten wir fest, daß bei hohen Durchflußraten die Perfusion mit calciumfreien Puffern zum Auswaschen der Calciumionen ausreichend ist. An diesen Schritt schließt sich die enzymatische Phase der Isolierungsmethode mit Zugabe von Kollagenase und Calciumchlorid an. Calciumionen aktivieren die Kollagenase (16) und reduzieren den Kaliumverlust der Zellen (4). Außerdem zeigten Zellen,

die aus Leberschnitten in Anwesenheit von Calcium gewonnen wurden, höhere Sauerstoffaufnahme- und eine besser erhaltene mitochondriale Struktur als Zellen, die in Abwesenheit von Calcium gewonnen wurden (17).

Im Rasterelektronenmikroskop ließen nach unserer Methode isolierte Parenchymzellen keine Substanzdefekte der Zellmembran erkennen (Abb. 1). Nur vereinzelt fanden sich Zellen, die als Zeichen der Membranschädigung unstrukturierte Vesikulationen aufwiesen.

In bezug auf Gluconeogenese und Proteinsynthese waren nach unserer Methode isolierte Parenchymzellen den Leberschnitten sowie den nach *Howard* (4) und *Berry* (1) isolierten Zellen deutlich überlegen. Die niedrige Syntheserate der Schnitte und der aus Schnitten isolierten Parenchymzellen (4) könnte darauf beruhen, daß die oberflächlich gelegenen Zellen durch den Schneidvorgang beschädigt werden und die Diffusion von Sauerstoff und Substraten in die tieferen Zelllagen limitiert ist.

Die ATP/ADP- und Lactat/Pyruvat-Quotienten lagen bei den von uns isolierten Zellen im physiologischen Bereich.

Im Gegensatz zu den von *Berry* isolierten Parenchymzellen, die kein Glykogen synthetisieren konnten (1), bauten die nach unserer Methode isolierten Zellen aus verschiedenen Substraten Glykogen auf (Abb. 2). Vergleichbare Syntheseleistungen wurden von *Wagle et al.* (18) und *Seglen* (19) berichtet.

Die Hormonempfindlichkeit der von uns isolierten Zellen wurde durch die Wirkung von Glukagon und Adrenalin auf den Glykogenstoffwechsel von Parenchymzellen gefütterter und gefasteter Ratten belegt sowie durch den Nachweis des Insulin-Glukagon-Antagonismus bei der Harnstoffsynthese (Abb. 3). Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, da die Hormonrezeptoren auf der äußeren Zellmembran enzymatischen Schädigungen wie z.B. durch Trypsin (10) leicht zugänglich sind. Die Integrität der Hormonrezeptoren kann außerdem als Bestätigung für den bei der morphologischen Analyse gewonnenen Eindruck einer intakten Zelloberfläche gewertet werden (20).

Die erzielten Ergebnisse und die dargelegten Vorteile gegenüber der Leberperfusion lassen nach der beschriebenen Methode isolierte Leberparenchymzellen als geeignetes Modell für die klinische Forschung erscheinen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des SFB 113 Diabetologie an der Universität Düsseldorf durch Sachmittel gefördert.

Frau M. Störmer danken wir für gewissenhafte Mitarbeit.

Literatur

1. Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969), *J. Cell Biol.* **43**, 506–520.
2. Morgan, J. F., Morton, H. J. & Parker, R. C. (1950), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**, 1–8.
3. Stadie, W. C. & Riggs, B. C. (1944), *J. Biol. Chem.* **154**, 687–690.
4. Howard, R. B., Lee, J. C. & Pesch, L. A. (1973), *J. Cell Biol.* **57**, 642–658.
5. Lamprecht, W. & Trautschold, J. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 2. Aufl., Bd. 2, 2024–2032. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
6. Seifter, R., Dayton, S., Novic, E. & Muntwyler, E. (1950), *Arch. Biochem. Biophys.* **25**, 191–200.
7. Rosenbauer, K. A. & Schlösser, H. W. (1973), *G-I-T Fachz. Lab.* **17**, 1370–1373.
8. Ingebretsen, W. R. jr. & Wagle, S. R. (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 403–410.
9. Hommes, F. A., Draisma, M. I. & Molenaar, J. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **222**, 361–371.
10. Johnson, M. E. M., Das, N.M., Butcher, F. R. & Fain, J. N. (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 3229–3235.
11. Capuzzi, D. M., Rothman, V. & Margolis, S. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **45**, 421–429.
12. Bojar, H. & Reiners, K. (unveröffentlichte Ergebnisse).
13. Seglen, P.O. (1972), *Exp. Cell Res.* **74**, 450–454.
14. Suzangar, M. & Dickson, J. A. (1970), *Exp. Cell Res.* **63**, 353–364.
15. Müller, M., Schreiber, M., Kartenbeck, J. & Schreiber, G. (1972), *Cancer Res.* **32**, 2568–2576.
16. Seifter, S. & Harper, E. (1970), in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., Eds.) Vol. XIX, 631, Academic Press, New York and London.
17. Howard, R. B. & Pesch, L. A. (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 3103–3109.
18. Wagle, S. R., Ingebretsen, W. R. jr. & Sampson, L. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **53**, 937–943.
19. Seglen, P.O. (1973), *FEBS Letters* **30**, 25–28.
20. Wagle, S. R. & Ingebretsen, W. R. jr. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **52**, 125–129.

Dr. Hans Bojar
Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
4000 Düsseldorf